大鼠胰岛素样生长因子结合蛋白 1（IGFBP-1）ELISA 试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供研究使用

预期应用

ELISA 法定量测定大鼠血清、血浆、细胞培养物上清或其它相关液体中 IGFBP-1 含量。

实验原理

本试剂盒应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定标本中 IGFBP-1 水平。用纯化的抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入 IGFBP-1 抗原、生物素化的抗大鼠 IGFBP-1 抗体、HRP 标记的亲和素，经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 IGFBP-1 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

试剂盒组成及试剂配制

1. 酶联板：一块（96 孔）

2. 标准品（冻干品）：2 瓶，每瓶临用前以样品稀释液稀释至 1ml，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 25000 pg/mL，做系列倍比稀释后，分别稀释成 25000 pg/mL，12500 pg/mL，6250 pg/mL，3125 pg/mL，1560 pg/mL，780 pg/mL，390 pg/mL ，其原液直接作为最高标准浓度，样品稀释液直接作为标准浓度 0 pg/mL，临用前 15 分钟内配制。

如配制 12500 pg/mL 标准品：取 0.5ml 25000 pg/mL 的上述标准品加入含有 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。

3. 样品稀释液：1×20ml/瓶。

4. 检测稀释液 A：1×10ml/瓶。

5. 检测稀释液 B：1×10ml/瓶。

6. 检测溶液 A：1×120ul/瓶（1：100）临用前以检测稀释液 A 1：100 稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100ul），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 1ul

检测溶液 A 加 99ul 检测稀释液 A 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

7. 检测溶液 B：1×120ul/瓶（1：100）临用前以检测稀释液 B1：100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。

8. 底物溶液：1×10ml/瓶。

9. 浓洗涤液：1×30ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。

10. 终止液：1×10ml/瓶（2N H_2SO_4）。

标本的采集及保存

1．细胞培养物上清：请离心后收集上清，并将标本保存于-20℃，且应避免反复冻融。

2．血清：标本请于室温放置 2 小时或 4℃过夜后于 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。

3．血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 30 分钟内于 2 - 8° C 1000 x g 离心 15 分钟，或将标本放于-20℃保存，但应避免反复冻融。

注：标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测。

操作步骤

各试剂在使用前平衡至室温。实验开始前，请提前配置好所有试剂，试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。每次检测都应该做标准曲线。如样品浓度过高时，应在试管中将样品用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100ul，余孔分别加标准品或待测样品 100ul，注意不要有气泡，加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37℃反应 120 分钟。

为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加检测溶液 A 工作液 100ul（取 1ul 检测溶液 A 加 99ul 检测稀释液 A 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制），37℃,60 分钟。

3. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。

4. 每孔加检测溶液 B 工作液（同检测 A 工作液） 100ul，37℃，60 分钟。

5. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。

6. 依序每孔加底物溶液 90ul，37℃避光显色（30 分钟内）（此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色，后 3-4 孔梯度不明显）。

7. 依序每孔加终止溶液 50ul，终止反应（此时蓝色立转黄色）。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。

8. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。 在加终止液后 15 分钟以内进行检测。

注：

1. 每次实验留一孔作为空白调零孔，该孔不加任何试剂，只是最后加底物溶液及 2NH2SO4。测量时先用此孔调 OD 值至零。

2．为防止样品蒸发，试验时将反应板放于铺有湿布的密闭盒内，酶标板加上盖或覆膜。

3. 未使用完的酶标板或者试剂，请于 2-8℃保存。标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液B 工作液请依据所需的量配置使用，不要一次用完。请勿重复使用已稀释过的标准品、检测溶液 A 工作液或检测溶液 B 工作液。

4. 建议检测样品时均设双孔测定，以保证检测结果的准确性。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将推荐的洗涤缓冲液至少 0.3ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，根据需

要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

特异性

本试剂盒可同时检测重组或天然的大鼠 IGFBP-1，且与其它相关蛋白无交叉反应。

计算

以标准物的浓度为横坐标（对数坐标），OD 值为纵坐标（普通坐标），在半对数坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

注意事项

1. 洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。

2. 一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。

3. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。

4. 如标本中待测物质含量过高，请先稀释后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数。

5. 在配制标准品、检测溶液工作液时，请以相应的稀释液配制，不能混淆。

6. 底物请避光保存。

说明

1. 在储存及孵育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和污染，试剂避免受到微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。

2. 小心吸取试剂并严格遵守给定的孵育时间和温度。请注意在吸取标本 / 标准品，酶结合物或底物时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的 “预孵育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。而且，洗涤不充分将影响试验结果。

3. 试剂盒保存：部分试剂保存于-20℃，部分试剂保存于 2-8℃，具体以标签上的标示为准。

4. 浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。

5. 刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。

6. 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。

7. 所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。

8. 有效期：6 个月